

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-30678

⑬ Int. Cl.³

C 12 N 15/53
9/02
//C 12 N 9/02
C 12 R 1:91

識別記号

ZNA

庁内整理番号

7823-4B

⑭ 公開 平成3年(1991)2月8日

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全11頁)

⑮ 発明の名称 ルシフェラーゼをコードするDNA化合物およびそれを含有する発現ベクター

⑯ 特 願 平1-167689

⑰ 出 願 平1(1989)6月29日

⑱ 発 明 者 フレデリック・一朗・ 大阪府吹田市春日4丁目11番3-107号
辻

⑲ 発 明 者 長 田 重 一 大阪府吹田市佐井寺2丁目21番17-511号

⑲ 発 明 者 エリック・マルコム・ 大阪府吹田市春日4丁目11番3-204号
トンプソン

⑳ 出 願 人 財団法人大阪バイオサ 大阪府吹田市古江台6丁目2番4号
イエンス研究所

㉑ 代 理 人 弁理士 青山 葆 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

ルシフェラーゼをコードするDNA化合物およびそれを含有する発現ベクター

2. 特許請求の範囲

1. ウミボタルルシフェラーゼをコードするDNA化合物。

2. 請求項1記載のDNA化合物を含有する発現ベクター。

3. プラスミドpRSVVLである請求項2記載の発現ベクター。

4. 請求項2または3記載の発現ベクターを用いて宿主細胞をトランスフェクトし、培養することからなるウミボタルルシフェラーゼの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

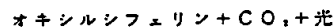
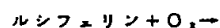
[産業上の利用分野]

本発明は、海洋性甲殻類であるウミボタル(*Vulgaria hilgendorffii*、以前は*Cypridina hilgendorffii*と分類されていた)の発光現象を触媒する酵素であるウミボタルルシフェラーゼをコードする

DNA化合物および該DNA化合物を含有する発現ベクター、並びに該発現ベクターを用いて適当な宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することからなるウミボタルルシフェラーゼの製造方法に関するものである。

[従来技術と発明が解決すべき課題]

ルシフェラーゼは様々な生物種で観察されている化学発光反応を触媒する酵素である。この発光反応は、酸素の存在下、基質ルシフェリンがルシフェラーゼの酵素作用によってオキシルシフェリンに酸化される反応であって、下記式で示される。



反応機構は生物種によって異なっており、補助因子としてATPなどのヌクレオチドを必要とするものもある。近縁種間では相互に反応し得ることも知られているが、基質特異性が極めて高く、同一種生物から得られたルシフェリンとルシフェラーゼとは反応するが、異種生物に由来する酵素と基質とは原則として、交差反応しないとされて

いる。

このようにルシフェラーゼの基質(ルシフェリン)特異性は極めて高く、その発光は鋭敏であることから、この酵素-基質の化学発光反応を利用して様々な物質の検出および/または定量を行うことができると考えられる。一般に酵素反応は、その基質特異性に起因して高感受性であり、かつ反応条件が温和であるために、様々な分野で応用されている。例えば、過酸化水素の存在下で酸化反応を触媒する西洋ワサビのペルキシダーゼは、極めて広範囲に利用されている酵素の一つである。とりわけ、この酵素は過酸化水素の発生を伴う反応を通じて検出し得る物質の分析には重要である。これ以外にも有用な酵素が抽出、単離されているが、様々な分野で、多様化する目的に応じて更に多くの利用可能な酵素が必要とされている。従って、発光反応を触媒する酵素であるルシフェラーゼを安定的に供給し得る方法が確立されれば、該酵素の新たな用途が開発されることが考えられる。

ところでルシフェラーゼには、その触媒活性の

クルルシフェラーゼを遺伝子工学により製造することに着目し、該酵素をコードするcDNAをクローニングし、そのDNA配列を決定した。次いで、このようにして得たDNA化合物を含有する発現ベクターを構築し、該発現ベクターを哺乳類の細胞で発現させ、培地中にウミボタルルシフェラーゼを分泌させることに成功した。

即ち、本発明は、ウミボタルルシフェラーゼをコードするDNA化合物を提供するものである。

また、本発明は、該DNA化合物を含有する発現ベクターを提供するものである。

また本発明は、該発現ベクターを用いて宿主細胞をトランスフェクトし、培養して培地からウミボタルルシフェラーゼを回収することからなるウミボタルルシフェラーゼの製造方法を提供するものである。

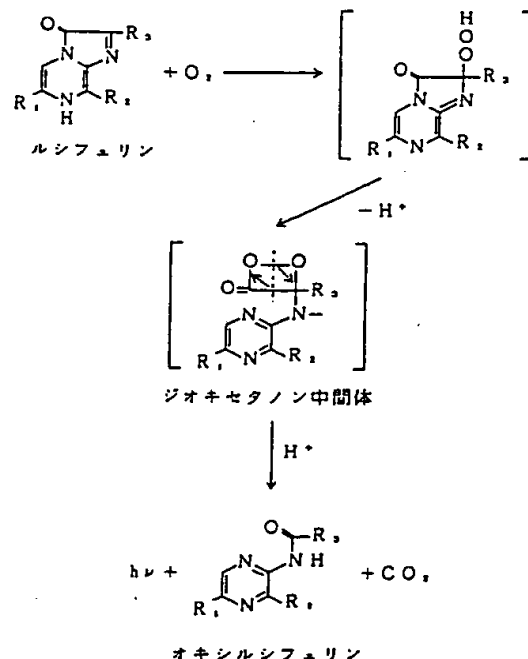
ウミボタルルシフェラーゼと基質ウミボタルルシフェリンの化学発光反応は十分に研究されている[ハーベィ(Harvey, E. N.), A. J. Physiol. 42 318-341, 1917およびジョンソン(Johnson, F.

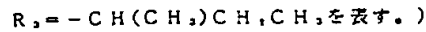
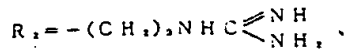
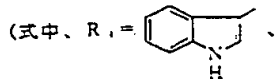
発現に、酵素およびルシフェリン以外の補助物質(微量のATPなどのヌクレオチド)を必要とするものと、必要としないものがある。前者に属するルシフェラーゼは補助物質(微量のATP)の検出などに利用されている。これに対して後者に属する酵素、例えばウミボタルルシフェラーゼは酵素と基質(この場合はウミボタルルシフェリン)以外の物質を必要としないことから、反応が単純であり、従って応用範囲が広く、有用性が高いと推測される。ウミボタルルシフェラーゼの応用分野の開発研究、並びに実用化を推進するためには、高純度のウミボタルルシフェラーゼが安定的に供給される必要がある。しかしながら、他の生物由来の酵素と同様に、生物からの酵素の抽出、単離および精製には、多くの時間と経費を要するので上記の需要を満たすことは困難である。従って、簡便かつ効率のよい、ウミボタルルシフェラーゼの製造方法の確立が望まれている。

[課題を解決するための手段]

本発明者らは、このような状況に鑑み、ウミボ

H.)ら、Methods Enzymol. 57 331-384, 1978]。その反応は下記の反応式で示される。





なお、λ_{max} = 460 nmである。

ウミボタルルシフェラーゼのcDNAのスクリーニング、ヌクレオチド配列の決定、発現ベクターの構築、宿主細胞のトランスフェクションおよび培養は当該技術分野で既知の方法を用いて行なわれた。その概要を以下に示す。

文献[ツジ(Tsujii, F. I.) Methods Enzymol. (57, 364-372, 1978)]記載の方法で部分精製したウミボタルルシフェラーゼをアフィニティーカラムを用いて完全に精製した。この標本を、そのままエドマン分解法に付した場合にはアミノ酸を帰属することができなかった。これはペプチドのN末端アミノ酸のアミノ基がブロックされていることを意味する。そこで、精製ウミボタルルシフェラーゼをエンドペプチダーゼで消化し、得られた

shita, K.)らによるJ. Biol. Chem. (262, 3844-3851, 1987)の記載に準じてcDNAライブラリーを構築した。

このcDNAライブラリーを上記オリゴヌクレオチドプローブを用い、ブラークハイブリダイゼーション法[ベントンおよびディビス(Benton, W. D. & Davis, R. W.), Science 195, 180-182, 1977]でスクリーニングした。陽性を示す8個のクローンから2個のクローンV L 16およびV L 18を選択し、制限酵素地図を作成した。クローンV L 16はルシフェラーゼのN-末端側を、V L 18はC-末端側を夫々コードしており、互いに830ヌクレオチドの重複部分を有する(第2図bおよびc)。そこでこれらの2断片をEco R I消化し、得られた断片をサブクローニングし、7-Deaza DNA配列決定キット(宝酒造)、および[α-³²P]dCTP(222 TBq/μmol)(New England Nuclear)を用いるジデオキシヌクレオチド鎖成長停止反応[サンガー(Sanger, F.)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467,

ペプチド断片をエドマン分解法に付すことによりアミノ酸配列を決定した。次いで、適当な部分を用いてオリゴヌクレオチドプローブを設計し、DNA合成装置(Applied Biosystems Inc., Model 381A)を用い、ホスホラミダイト法(phosphoramidite method)[カルーサーズ(Caruthers, M. H.), Synthesis and Applications of DNA and RNA, 編集:ナラング(Narang, S. A.)(Academic Press, New York), pp.47-94, 1987]によりオリゴヌクレオチドプローブを合成した。

他方、千葉県で採集したウミボタル(フジ、前掲)を液体窒素中で微粉末に粉碎し、この粉末をチオシアン酸グアニジン/塩化セシウム法[チグウィン(Chigwin, J. M.)ら、Biochemistry 18, 5294-5299, 1979]で処理して全細胞RNAを抽出した。次いで、オリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィ[アビブ(Aviv, H.)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412, 1972]にかけてポリ(A)RNAを精製し、モリシタ(Mori

1977 およびチェン(Chen, E. Y.)ら、DNA 4, 165-170, 1985]によってヌクレオチド配列を決定した。完全長のcDNAの制限酵素地図を第2図aに、ヌクレオチド配列および推定のアミノ酸配列を第3図に示す。この推定のアミノ酸配列は上記のエドマン分解法で決定したアミノ酸配列と完全に一致していた。

次にクローンV L 16およびV L 18から構築した完全長のcDNAクローン(第2図d参照)を用いて発現ベクターを構築した。発現ベクターは原核性または真核性のいずれであってもよい。当業者にとっては、適当な出発物質としてのベクターを選択し、これに所望のペプチドをコードするDNA化合物を挿入し、該ペプチドの発現ベクターを構築する方法は周知である。本明細書では、生成物が培養地に分泌されるために処理が容易であることから、哺乳類の細胞で発現可能な発現ベクターを例示した。本発明の例示ベクターであるブラ

ロングターミナルリピートのプロモーターの下流に含有している。このプラスミドpRSVV Lを用い、常法通り宿主細胞をトランスフェクトする。トランスフェクションの方法および宿主細胞は適宜選択し得るが、本発明においては、リン酸カルシウム法(Graham, F. L.ら、Virology 52, 456-467, 1973 および Wigler, M.ら、Cell 14, 725-731, 1978)によりサルのCOS細胞[グルツマン(Glutman, Y.), Cell 23, 175-182, 1981, (7×10⁶)]をトランスフェクトした。ウミボタルルシフェラーゼの発現に適した培地でインキュベートした後、培地を回収し、細胞を収獲して細胞抽出物を調製した。

このようにして得られた培地および細胞抽出物のウミボタルルシフェラーゼ活性をMitchell-Hastings光度計により測定した[ミッチェル(Mitchell, G. W.)ら、Anal. Biochem. 39, 243-250]。その結果、細胞抽出物から検出されるウミボタルルシフェラーゼ活性は僅かであったが、培地からは明確なトランスフェラーゼ活性が検出された(第

4図)。この発光は極めて鋭敏であって、培地10μl中の5μlを用いバックグラウンドよりも明らかに高いシグナルが検出された。

このように、本発明によればウミボタルルシフェラーゼを遺伝子工学的に、容易に製造することができる。

本発明によりホタルルシフェラーゼをコードするDNA化合物のヌクレオチド配列が明らかにされたので、当業者は遺伝子工学における既知の手段を用いて容易にホタルルシフェラーゼを製造することができる。本発明のウミボタルルシフェラーゼをコードするDNA化合物の発現に適した発現ベクターの構築のための出発物質(プロモーター等を含む発現ベクター)および宿主細胞は多数知られており、本明細書に例示したプロモーター-宿主系以外の系を選択して本発明方法と同様の効果をあげることができる。当業者にとって、適当なプロモーター-宿主系を選択し、発現ベクターを構築し、得られた発現ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、培養して生成物を単離する方

法は既知である。従って、当業者ならば、本発明が例示のプラスミド、pRSVV Lに限定されるものではなく、本発明のウミボタルルシフェラーゼをコードするDNA化合物の発現に適したあらゆる発現ベクターを包含するものであるということとを容易に理解するであろう。そのような他の発現ベクターに適するプロモーターとして、下記のものを挙げることができる。

即ち、動物細胞での発現のプロモーターとしては、サルSV40ウイルスプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、アデノウイルスプロモーター、AIDSウイルスプロモーター、痘多角形ウイルスプロモーターなどである。この際、マウスNIH 3T3細胞、C127細胞、L細胞、ハムスターCHO細胞、ヒトHeLa細胞や蚕などを宿主細胞として用いることができる。また、原核細胞での発現プロモーターとしては、λファージPLプロモーター、T_{ac}プロモーター、T₇プロモーター、lacプロモーターなどが知られており、大腸菌を宿主として発現させることができ

る。さらに、酵母や枯草菌を宿主として、それに適するプロモーターを使用して、ウミボタルルシフェラーゼを発現させることも可能である。

以下に実施例を示し、本発明をさらに詳細に説明する。

実施例1 ウミボタルcDNAのクローニング

1. ウミボタルルシフェラーゼの精製および配列決定

ツジ(Tsujii, F. I.)の方法[Methods Enzymol. (57, 364-372, 1978)]に従って部分精製したウミボタルルシフェラーゼを2.0M NaCl/0.07M Tris-HCl(pH 7.2)中で平衡させたトリプタミアフィニティカラム(Pierce Chemical)を用い、30%エチレングリコール/0.17M NaCl/0.07M Tris-HCl(pH 7.2)で段階的に溶離した。次いで、限外濾過によって濃縮した後、p-アミノベンズアミジンアフィニティカラム(Pierce Chemical)を用い、同様のクロマトグラフィ条件下、均質になるまで精製した。

精製したウミボタルルシフェラーゼのドデシル

硫酸ナトリウム／勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。勾配10-15%ファストゲル(PhastGel)(Pharmacia)により試料を分析し、ファストゲル銀染色キット(Pharmacia)でタンパク質を観察すると、Mr68,000の一本の帯を示した。結果を第1図に示す。図中、レーン1はファルマシア製の低分子量マーカーであり、レーン2はアフィニティクロマトグラフィーで精製したウミボタルルシフェラーゼ(5.0ng)である。マーカータンパク質の分子量はキログルトンで示されている。

精製したタンパク質120μgを、トリプシン(Bioehringer-Mannheim)、リシルエンドペプチダーゼ(和光純薬)またはアルギニルエンドペプチダーゼ(宝酒造)によってエンドペプチダーゼ消化した。この消化物をC₁₈-タンパク質-ペプチドHPLCカラム(Vydac)を用いる逆相クロマトグラフィーにかけ、各々のペプチド断片を単離した。次いで気相タンパク質シークエネーター(Applied Biosystems Inc., Model 477A)を用いるエドマ

ン分解法によって、未消化のルシフェラーゼと精製ペプチドのN-末端アミノ酸配列を決定した。

2. mRNAの調製およびcDNAのライブラリー構築

千葉県で採集したウミボタル(フジ、前掲)を即座に液体窒素中で凍結させた。このウミボタル(オスタコッズ、ostacods)(重量5g)を、ウルトラクターホモジナイザー(ultraturrax homogenizer)(Janke & Kunkel)を用い、液体窒素中で微粉砕した。この微粉末をチオシアン酸グアニジン／塩化セシウム法[チグウィン(Chigwin, J. M.)ら、Biochemistry 18, 5294-5299, 1979]に付して全細胞RNAを抽出した。次いで、オリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィー法[アビブ(Aviv, H.)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412, 1972]によってポリ(A)RNAを精製した。このmRNAを用いてcDNAライブラリーを構築したが、その際低融解アガロース(BioRad)を用いる2回の精製で二本鎖のEcoRI消化cDNAをサイズ選別する外は、モリシタ(M

orishita, K.)らの方法[J. Biol. Chem. (262, 3844-3851, 1987)]に従った。

3. cDNAクローンのスクリーニング

上記1.で調製したペプチドフラグメントの一部分はコドンアンビギュイティが最小であるペプチド配列、Thr-Met-Glu-Asn-Leu-Asp-Gly-Gln-Lysを有していた。これを用い、コドン縮重性が高い3箇所にデオキシイノシンを含ませ[オーツカ(Ohtsuka, E.)ら、J. Biol. Chem. 260, 2605-2608, 1985]、下記の相補オリゴヌクレオチドプローブを設計した：

5'(T/C)TT(T/C)TGICG(A/G)TCIAGGTT(T/C)TCCATIGT3'

さらに、15位にGの代わりにAを有する第2の相補プローブを合成した。オリゴヌクレオチドプローブの合成はDNAシンセサイザー(Applied Biosystems Inc., Model 381A)により、ホスホラミグイト法[カルーサー(Caruthers, M. H.), Synthesis and Applications of DNA and RNA, Narang, S. A. 編, (Academic Press, New York), pp. 47-94, 1987]で行った。

このオリゴヌクレオチドプローブを、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造)および[γ-³²P]ATP(222TBq/μmol, New England Nuclear)を用いて5'末端標識(比活性：5-6×10⁸cpa/μmol)、得られた2プローブの混合物を用いてブランクハイブリッド法[ベントンおよびディビス(Benton, W. D. & Davis, R. W.), Science 196, 180-182, 1977]により、上記2.で調製したウミボタルcDNAライブラリーをスクリーニングした。即ち、このプローブを用いて1×10⁶個の組換えファージをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、温度を28℃に下げ、フィルターを37℃でSSC(0.15M NaCl, 1.5mMクエン酸ナトリウム, pH7.0)により洗浄する外は、ウォール(Wahl, G. M.)らの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA (76, 3683-3687, 1979)]に従って行われた。ライブラリーから8つの陽性クローンを単離し、その内、挿入長さ1.2kbおよび1.5kbのクローンVL16およびクローンVL18を選択してさらに分析し、

制限酵素地図を作成した。これらのクローンの制限酵素地図を第2図に示す。

4. ウミボタルルシフェラーゼのヌクレオチド配列の決定

第2図bおよびcから分かるように、クローンV L 1 6 およびクローンV L 1 8 には夫々、単一の内部Eco R 1 部位があり、830個のヌクレオチド配列の重複部分がある。これらの両クローンのEco R 1 断片をpUC 8でサブクローニングした。7-Deaza DNA配列決定キット(Takara Shuzo)を使用し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (222 T Bq/ μmol)(New England Nuclear)を用いるジデオキシヌクレオチド鎖成長停止反応[サンガー(Sanger, F.)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74**, 5463-5467, 1977 および チェン(Chen, E. Y.)ら、DNA **4**, 165-170, 1985)]に付してヌクレオチド配列を分析した結果、クローンV L 1 6 はルシフェラーゼのN-末端部分をコードし、クローンV L 1 8 はC-末端部分をコードしていることがわかった。これらのクローンから構築さ

れた完全長のウミボタルルシフェラーゼcDNAの制限地図を第2図aに、ヌクレオチド配列および推定のアミノ酸配列を第3図に示す。第2図aにおいて、斜線部分は、推定のシグナル配列である。第3図において、各列の上に記した番号はヌクレオチド位置であり、各列の下に記した番号はアミノ酸位置である。水平方向の矢印は、エンドペプチダーゼ消化によって得られたアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有する領域を表す。N-グリコシル化に適合する配列を四角で囲み、ポリ

アデニル化シグナルAATAAAを下線で示した。この配列から計算されるウミボタルルシフェラーゼの分子量は62,171ダルトンであり、555個のアミノ酸からなるタンパク質をコードする、1665個のヌクレオチドからなるオープンリーディングフレームを含んでいる。このオープンリーディングフレームには、オリゴヌクレオチドプローブの構築に用いたアミノ酸配列が含まれている。また、エドマン分解法によって決定した他の7個のペプチドのアミノ酸配列は、ヌクレオ

チド配列から推定されるアミノ酸配列と完全に一致していた。

翻訳開始コドン(16番目のヌクレオチド)から始まるATGコドンに当たった。この推定の開始コドンの周囲のヌクレオチド配列は、多くの真核生物のmRNAに特徴的なコンセンサス配列CCA(A/G)CCAUGGと一致している[コザック(Kozak, M.), Cell **15**, 1109-1123, 1978]。N-末端のアミノ酸配列は、分泌タンパク質としてのルシフェラーゼの生物学的役割を果たすために、シグナル配列の特徴を多数有している[フォン・ハイネ(von Heijne, G.), Eur. J. Biochem. **133**, 17-21, 1983]。なお、ブロックされているN-末端は後述の方法で予想された。

過ヨウ素酸-シッフ反応によるルシフェラーゼ陽性染色によっても示されたが、アミノ酸残基186および408位に2つのN-グリコシル化部位(Asn-X-Ser/Thr)がある。残基258位には配列Asn-Pro-Serが存在しているが、一般にこの配列は効率良くグリコシル化されない[マー

シャル(Marshall, R. D.), Ann. Rev. Biochem. **41**, 673-702, 1972]。N-グリコシダーゼFを作用させるとルシフェラーゼ分子の大きさは2000-3000ダルトン減少するが、O-グリコシル化部位に特異的な消化酵素ではこのような減少は認められない。これらの結果は、ウミボタルルシフェラーゼがN-グリコシル化されること、ならびにヌクレオチド配列から推定されるポリペプチドの理論分子量と、ゲル電気泳動(第1図)およびゲル濾過と沈降平衡分析(ツジら、Biochemistry **13**, 5204-5209, 1974)で測定した天然タンパク質の分子量との差が炭水化物部分の非存在または存在に関連していることを示している。

アミノ末端は、ルシフェリンの構造および反応機構が類似している他の海洋生物の生物発光反応を触媒する酵素の構造から類推した。そのような生物としてクラゲ(*Aequorea victoria*)を選び、その生物発光反応と直接比較した[ジョンソン(Johnson, F. H.)ら、Methods Enzymol. **51**, 271-291, 1978]。

クラゲの発光は、カルシウム結合タンパク質、エクオリンによるものであって、このエクオリンがカルシウムイオンの存在下で励起されて発光する。エクオリンは、アポエクオリン(アポタンパク質)、コエレンテラジンおよび酸素分子の錯体であって、エクオリンがカルシウムイオンと結合すると、配座変化が起こり、タンパク質がオキシゲナーゼに転換され、次いで、分子内反応によりコエレンテラジンが酸化される。この反応における発光体はアポエクオリンに結合した励起状態のコエレンテラジンである[シモムラ(Shimomura, O.)ら、Tetrahedron Lett. No. 31, 2963-2968, 1973]。

ウミボタルとクラゲの生物発光反応の基質構造および機構は相互に類似しているが殆ど交差反応しない。しかしながら、両者のアミノ酸配列の比較から、ウミボタルルシフェラーゼの2領域(残基97~154および残基353~411)のアミノ酸配列が、アポエクオリンの1領域(残基82~144)のアミノ酸配列と有意な類似性を示

ノ酸残基が分泌に必要なリーダーペプチドであり、ウミボタルルシフェラーゼのN-末端が12番目のチロシンであることを示唆するものである(第3図参照)。さらに、アラニンと隣接アミノ酸残基との関係はシグナル配列の開裂部位に適合している[フォン・ハイネ(von Heijne, G.)ら、Eur. J. Biochem. 133, 17-21, 1983]。以上から、ペプチドの開裂部位は11位であり、アミノ末端はチロシンであると予想される。

ウミボタルルシフェラーゼのアミノ酸配列のもう1つの特徴は、非常にシステインに富む領域がN-末端部分に存在することである。この領域ではアミノ酸残基39~82の間に9個のシステイン残基が認められる。しかしながら、ウミボタルルシフェラーゼには遊離のスルヒドリル基が検出されなかった(ツジら、前掲)ことから、システイン残基はおそらく分子内のジスルフィド架橋結合を形成していると考えられる。

実施例2 ウミボタルルシフェラーゼを含有する発現ベクターの構築

すことが分かった(第5図参照)。第5図は、ウミボタルルシフェラーゼ(a)とクラゲ(*Aequorea*)のエクオリン(b)とのアミノ酸配列の相同性を示す図であって、Dayhoffの突然変異データマトリックス[デイホッフ(Dayhoff, M. O.), Schwartz, R. M.ら、Atlas of Protein Sequence and Structure(National Biochemical Research Foundation, Washington, D. C.), Vol. 5, pp. 345-352, 1978]における同一残基を2つの点(:)で示し、類似アミノ酸を1つの点(・)で示したものである。番号は各タンパク質のN-末端からの位置を表す。アポエクオリン分子の大きさはウミボタルルシフェラーゼの約1/3であり、189個のアミノ酸残基からなっており、ウミボタルルシフェラーゼの類似領域の一方または両方が発光に関与していると予測される。

アポエクオリンの残基87~144に相当するウミボタルルシフェラーゼの領域は残基97~154であり、明らかに10アミノ酸残基のシフトが認められる。このことは、最初の11個のアミ

完全長のウミボタルルシフェラーゼのcDNAをラウス肉腫ウイルスのロングターミナルリピートのプロモーターの下に置いて発現ベクターを構築した。即ち、ウミボタルルシフェラーゼcDNAの5'末端および3'末端に、それぞれHindⅢおよびBglⅡリンカー(宝酒造)を連結した。Dr. S. Subramaniから得たホタルルシフェラーゼをコードするプラスミドpRSVL[ドゥエット(de Wet, J. R.)ら、Mol. Cell. Biol. 7, 725-737, 1987]をSmaⅠで消化し、BglⅡリンカーと連結した。次いで、HindⅢおよびBglⅡで切断して得た線状プラスミドと、上記cDNAのHindⅢおよびBglⅡ断片とを連結することにより、ホタルルシフェラーゼcDNAの代わりにウミボタルルシフェラーゼcDNAを含有するHindⅢ-BglⅡ断片を含有する発現プラスミドpRSVLを得た。このプラスミドで形質転換した大腸菌、Escherichia coli pRSVLは工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている(受託日:平成元年6月15日、受託番号:FERM

P-10782)。

実施例3 プラスミドpRSVVLによるCOS細胞のトランスフェクションおよびウミボタルルシフェラーゼの発現

1. トランスフェクション

10cmのベトリ皿に入れた10%ウシ胎児血清(Hyclone)を含有するダルベッコ(Dulbecco)の改良イーグル培地(日水)10μlにサルCOS細胞[グルツマン(Glutman, Y., Cell 23, 175-182, 1981; ATCC CRL 1650)]を播いた(7×10⁴)。この細胞を、リン酸カルシウム法[グラハム(Graham, F. L.)ら、Virology 52, 456-467, 1973およびウィグラー(Wigler, M.)ら、Cell 14, 725-731, 1978]を用い、実施例2で調製したプラスミドpRSVVL DNA 10μgでトランスフェクトした。48時間インキュベートした後、培地を回収し、細胞を収獲した。次いで、細胞を凍結および解凍を繰り返した後、遠心分離することによって細胞抽出物を調製した(deWet, J. R. ら、前掲)。

ング(Hastings J. W.)ら、J. Opt. Soc. Am. 53, 1410-1415, 1963]。その結果、トランスフェクトされたCOS細胞の細胞抽出物に僅かなルシフェラーゼ活性が検出された。しかし、COS細胞の培養培地には大量のルシフェラーゼ活性が検出された(第4図参照)。この培養培地からの発光は被検培地の容量に正比例しており、発光は極めて鋭敏であった。即ち、ウミボタルルシフェラーゼ発現ベクターでトランスフェクトされたCOS細胞の培養培地10μlから得た僅か5μlの試料から、バックグランドよりも明らかに高いシグナルが検出された。これに対して、DNAをトランスフェクトしていないCOS細胞の培養液かまたはpSVOCAT[ゴーマン(Gorman, C. M.)ら、Mol. Cell. Biol. 2, 1044-1051, 1982]もしくはpRSVL[ドゥウェット(deWet, J. R.)ら、Mol. Cell. Biol. 7, 725-737, 1987]でトランスフェクトされたCOS細胞の培地および細胞抽出物からの発光は、第4図記載の発光よりも2桁以上弱かった。

2. ウミボタルルシフェラーゼ活性の測定

1. で調製した細胞抽出物および培地のウミボタルルシフェラーゼ活性を、ウミボタルルシフェリンを基質として測定した。

容量20μlのシンチレーションバイアル中、上記1. で得た培地あるいは細胞抽出物を、200mM Tris-HCl(pH 7.6)により希釈して全量を1.5μlとし、Mitchell-Hastings光度計に入れた[ミッチェル(Mitchell, G. W.)ら、Anal. Biochem. 39, 243-250, 1971]。他方、ツジの方法[Methods Enzymol. (57, 364-372, 1978)]に従って調製したウミボタルルシフェリンを200μMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8)に溶解(濃度50μM)し、その1.5μlをシンチレーションバイアルに注入した。ルシフェリンを注入する直前に光度計のシャッターを開放し、注入した点を0minとし、1.5min後にシャッターを閉じ、その間の発光を記録した。

¹⁴C-ヘキサデカン光を標準として光度測定し、光度を1秒当たりの光量子数に変換した[ハッシ

以上の結果は、再構成されたcDNAが完全長のウミボタルルシフェラーゼcDNAであること、そのcDNAがタンパク質を分泌するのに必要なシグナル配列をもコードしていることを示すものである。

[作用]

本発明のウミボタルルシフェラーゼをコードするDNA化合物を用いて所望の宿主内でホタルルシフェラーゼを発現させることができる。ウミボタルルシフェラーゼとウミボタルルシフェリンとの化学発光反応は酸素分子のみを必要とする単純な反応である。しかし基質特異性が高く、発光の測定感度は鋭敏である。しかも、実施例に示すように、本発明の発現ベクターでトランスフェクトされたCOS細胞は、ウミボタルルシフェラーゼを培養培地に分泌することから、生成物の回収が極めて容易である。これらの事実は、本発明のウミボタルルシフェラーゼをコードするDNA化合物の有用性を明確に示すものである。従って、本発明のDNA化合物は生物医学の分野に限らず、

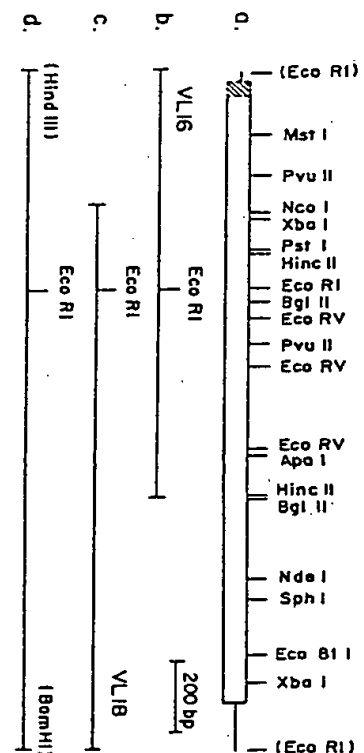
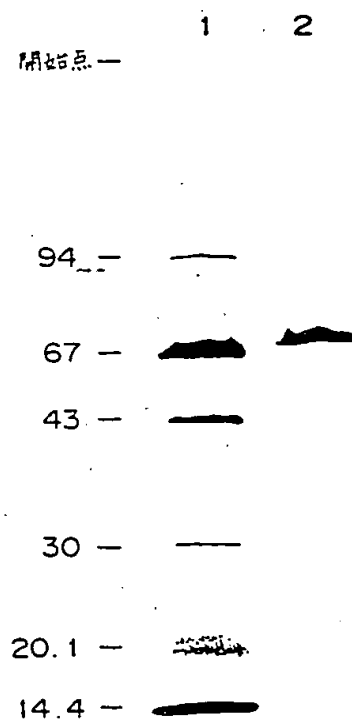
特許出願人 財団法人 大阪バイオサイエンス研究所
代理人 弁理士 青山 稔 (外2名)

環境を始め、様々な分野で有用と思われる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、精製したウミボタルルシフェラーゼのドデシル硫酸ナトリウム／勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を表す写真の模写図である。第2図は、ウミボタルルシフェラーゼcDNAの制限酵素地図および全長クローンの構築に用いたクローンの制限酵素地図である。(a)は完全長のウミボタルルシフェラーゼcDNA、(b)はクローンVL16、(c)はクローンVL18の制限酵素部位を示す制限酵素地図であり、(d)はクローンVL16およびVL18から構築された完全長cDNAの制限酵素地図である。第3図は、ウミボタルルシフェラーゼcDNAのヌクレオチド配列および推定のアミノ酸配列を示す模式図である。第4図は、COS細胞によって合成され分泌されたウミボタルルシフェラーゼの活性の測定結果を示すグラフである。第5図はウミボタルルシフェラーゼ(a)とクラゲのエクオリシン(b)アミノ酸配列の相同性を示す模式図である。

第1図



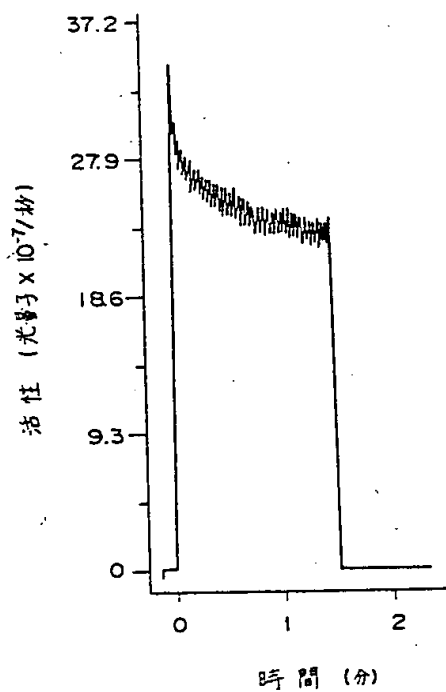
第3図(a)

10
 CAAACCCACACACC ATC AAG ATA ATA ATT CTC TCT GTT ATA TTG GGC TAC TGT CTC ACC GAC AAC TGT CAA CAT CCA TGT CCT CTA GAA 90
 Met Lys Ile Ile Ile Leu Ser Val Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Asp Asn Cys Gln 20
 110
 CCG GAA CCG CCA TCA AGT ACA CCA ACA GTT CCA ACT TCT TGT GAA GCT AAA GAA GGA TGT ATA CAT ACC AGA TGC GCA ACA TGT AAA 170
 Ala Glu Pro Pro Ser Ser Thr Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys 30
 120
 CGA CAT ATA CTA TCA CAT GGA CTG TGT GAA AAT AAA CCA GGG AAG ACA TCC TCT AGA ATG TCC CAG TAT CTC ATT GAA TGC ACA CTA GAA 270
 Arg Asp Ile Leu Ser Asp Gly Leu Cys Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln Tyr Val Ile Glu Cys Arg Val Glu 50
 130
 CCA GCT GGT TAT TTT AGA ACC TTT TAC GGC AAA AGA TTT AAT TTT CAG GAA CCT GGT AAA TAT CTC CTC GGT ACC GCA ACC AAG GGT GGC 350
 Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys Arg Phe Asn Phe Gln Glu Pro Gly Lys Tyr Val Leu Ala Arg Gly Thr Lys Gly Gly 70
 140
 GAT TGC TCT CTA ACC CTC ACC ATG GAG AAT CTA CAT CCA CAG AAG GGA GCT CTC CTC ACT AAG ACA ACA CTC GAG CTT GCA GCA CAC CTA 450
 Asp Trp Ser Val Thr Leu Thr Met Glu Asn Leu Asp Gly Gln Lys Gly Ala Val Leu Thr Lys Thr Thr Leu Glu Val Ala Gly Asp Val 110
 150
 ATA GAC ATT ACT CAA GCT ACT CCA CAT CTT ATC ACA GTT AAC GCA GCA GCT GAC CCA GTT ATC GCT AAC CCG TTC ACA ATT GGT CAG CTC 530
 Ile Asp Ile Thr Gln Ala Thr Ala Asp Pro Ile Thr Val Asn Gly Gly Ala Asp Pro Val Ile Ala Asn Pro Phe Thr Ile Gly Glu Val 170
 160
 ACC ATT GCT GTT GTT GAA ATA CCG GCG TTC AAT ATC ACA GTC ATC GAA TTC TTT AAA CTA ATC CTC ATT CAT Ile Asp 630
 Thr Ile Ala Val Val Glu Ile Pro Gly Phe Asn Ile Thr Val Ile Glu Phe Phe Lys Leu Ile Val Ile Asp 200
 170
 CTC AGA ATT GCT CCA GAC ACA CCA AAC AAA GGA CTC ATA TCT GGT ATC TGT GGT AAT CTC GAG ATG AAT GAC GGT CAT TTT ACT ACA 710
 Val Arg Ile Ala Pro Asp Thr Ala Asn Lys Gly Leu Ile Ser Gly Ile Cys Gly Asn Leu Glu Met Asn Asp Ala Asp Asp Phe Thr Thr 230
 180
 CAT GCA CAT CAG CTC GCG ATC CAA CCG AAC ATA AAC AAA GAG TTC CAC GCG TGC CCA TTC TAT GGC AAT CCT TGT CAT ATC GAA TAC TCC 810
 Asp Ala Asp Gln Leu Ala Ile Glu Pro Asn Ile Asn Lys Glu Phe Asp Gly Cys Pro Phe Tyr Gly Asn Pro Ser Asp Ile Glu Tyr Cys 260
 190
 AAA GGT CTC ATG GAG CCA TAC ACA GGT GTA TGT CCT AAC AAT ATC AAC TTC TAC TAT TAC ACT CTA TCC TGT GGT TTC GCT TAC TGT ATG 890
 Lys Gly Leu Met Glu Pro Tyr Arg Ala Val Cys Arg Asn Asn Ile Asn Phe Tyr Tyr Tyr Thr Leu Ser Cys Ala Phe Ala Tyr Cys Met 290

第3図(b)

910
 GCA GGA GAA GAA AGA GCT AAA CAC GTC CTT TTC GAC TAT GTT GAG ACA TCC GCT CCG CCG GAA ACG AGA GCA ACG TGT GTT TTA TCA GGA 990
 Gly Gly Glu Glu Arg Ala Lys His Val Leu Phe Asp Tyr Val Glu Thr Cys Ala Ala Pro Glu Thr Arg Gly Thr Cys Val Leu Ser Gly 300
 1010
 CAT ACT TTC TAT GAC ACA TTC GAC AAA GCA AGA TAT CAA TTC CAG GGC CCA TGC AAC GAG ATT CTC ATG GCC GCA GAC TGT TAC TGG AAC 1070
 His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg Tyr Gln Phe Gln Gly Pro Cys Lys Glu Ile Leu Met Ala Ala Asp Cys Tyr Trp Asn 350
 1100
 ACA TGG CAT GTA AAG GTT TCA CAT AGA GAC GTC GAA TCA TAC ACT GAG CTA GAG AAA GTA ACA ATC AGG AAA CAG TCA ACT GTA GTA GAT 1170
 Thr Trp Asp Val Lys Val Ser His Arg Asp Val Glu Ser Tyr Thr Glu Val Glu Lys Val Thr Ile Arg Lys Glu Ser Thr Val Val Asp 380
 1200
 CTC ATT GTC GAT GGC AAG CAG GTC AAG GTT GCA GGA GTG GAT GTA TCT ATC CCG TAC AGC TCT GAG AAC ACT TCC ATA TAC TGG CAG GAT 1250
 Leu Ile Val Asp Gly Lys Gln Val Lys Val Gly Gly Val Asp Val Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Gln Asp 410
 1300
 GGA GAC ATC CTC ACG ACG GCC ATC CTA CCT GAA GCT CTT GTC GTT AAG TTC AAC TTT AAG CAG CTC CTT GTA GTT CAT ATC AGA GAT CCA 1350
 Gly Asp Ile Leu Thr Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe Asn Phe Lys Gln Leu Leu Val Val His Ile Arg Asp Pro 440
 1400
 TTC CAT GGA AAG ACA TGC GCG ATA TGT GGT AAC TAT AAT CAA GAT TCA ACT GAT GAT TTC TTT GAC GCA GAA GGA CCA TGC GCT CTA ACC 1430
 Phe Asp Gly Lys Thr Cys Gly Ile Cys Gly Asn Tyr Asn Gln Asp 460
 1500
 CCC AAC CCC CCA GGA TGT ACA GAG GAA CAG AAA CCA GAA GCT GAG CCA CTT TGC AAT AAT CTC TTT GAT TCT TCT ATC GAC GAG AAA TGT 1530
 Pro Asn Pro Pro Gly Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Asn Leu Phe Asp Ser Ser Ile Asp Glu Lys Cys 500
 1600
 AAT GTC TGC TAC AAG CCT GAC CCG ATT GCC CCA TGT ATG TAC GAG TAT TGC CTC AGG GGA CAA CAA GGA TTT TGT GAC CAT GCT TGG GAG 1610
 Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly Phe Cys Asp His Ala Trp Glu 530
 1700
 TTC AAG AAA GAA TGC TAC ATA AAA CAT CCA GAC ACT CTA GAA GTA CCA CTT GAA TGT CAA TAA ACGTACAAAGATACAGAACTAAGGCTACTACAGC 1710
 Phe Lys Lys Glu Cys Tyr Ile Lys His Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln End 550
 1800
 ACAAGATAAAAAAGAACTGTAGTCTCTCAAAAAACCGTGTATTTTATCTACTCTATTGTTAATTAGAGCAAAATAAATTGTTATTATCATAACTTAAAGTAAAAAAGAAAAA 1830

第 4 题



第 5 図

```

a .      100      120      140
   KRFNFQEPGKYVLRGTXGGDWSVTLTMENLDGQKGAVLTKTTLLEVAGDVIDITQATAD
   . . . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
b .      90      110      130
   KKLATDELEKYAKNEPTLIRIWGDAL-FDIVDKDQNGAITLDDEWKAYTKAAGIIQSSSED
   . . . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

a .      360      380      400
   YWNTWDVKVSHRDVESYTEVEKVTIRKQSTVVDLIVDGKQVKVGGVDVSIPIYSSENTSI
   . . . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
b .      90      110      130
   YIEGWK-KLATDELEKYAKNEPTLIRIWGDALFDIVDKDQNGAITLDDEWKAYTKAAGII
   . . . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```